

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月4日 (04.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/00173 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 9/127

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04140

(22) 国際出願日: 2000年6月23日 (23.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/178142 1999年6月24日 (24.06.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 協和醸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 加藤泰己 (KATO, Yasuki) [JP/JP]. 山内雅博 (YAMAUCHI, Masahiro) [JP/JP]. 草野宏子 (KUSANO, Hiroko) [JP/JP]. 石原淳 (ISIHARA, Atsushi) [JP/JP]; 〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩1188 協和醸酵工業株式会社 医薬総合研究所内 Shizuoka (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

/統葉有/

(54) Title: METHOD OF REGULATING LEAKAGE OF DRUG ENCAPSULATED IN LIPOSOMES

(54) 発明の名称: リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法

(57) Abstract: A method of regulating the leakage of a drug encapsulated in liposomes by satisfying at least two of the following three requirements, i.e., using two or more bilayer lipid membranes of the liposomes, controlling the average particle diameter of the liposomes to 120 nm or more, and using, as the lipid constituting the liposomes, a lipid having a phase transition temperature higher than the bodily temperature; and a liposome preparation stable *in vivo* which satisfies at least two of the following three requirements, i.e., using two or more bilayer lipid membranes of the liposomes, adjusting the average particle diameter of the liposomes to 120 nm or more, and using, as the lipid constituting the liposomes, a lipid having a phase transition temperature higher than the bodily temperature.

(57) 要約:

リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リポソームの平均粒子径を120 nm以上にすること、およびリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの3つから選ばれる2つ以上を満たすことにより、リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法を提供する。また、リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であること、リポソームの平均粒子径が120 nm以上であること、およびリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であることの3つから選ばれる2つ以上を満たす生体内で安定なリポソーム製剤を提供する。

WO 01/00173 A1



添付公開 類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法

技術分野

本発明は、リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリポソーム製剤に関する。

背景技術

リポソームに薬物を内包させて薬物の効果を高める技術は、すでに医療現場で治療に使われており、臨床応用は主として注射により行われている。注射の中でもとりわけ血管内部に投与される場合、リポソームに内包された薬物が比較的長時間漏出することなくリポソーム内に存在することは、治療効果を高める上で重要である。

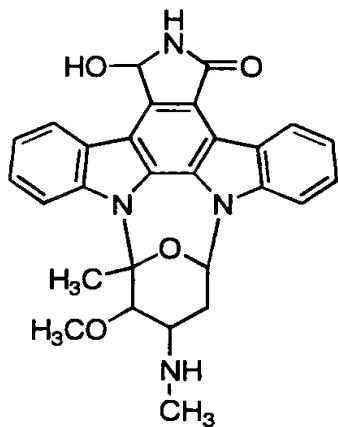
ビーは、抗腫瘍剤のリポソームからの漏出を抑制する方法を見い出している（特許第2572554号公報）。これによると、リポソームの内外に帶電した物質の濃度勾配を作ることにより膜貫通ポテンシャルを発生させ、イオン化可能な薬物をpH勾配やNa⁺／K⁺濃度勾配でリポソーム内部に封入することにより、薬物がリポソームから漏出するのを抑制する。さらに、同様なpH勾配を利用して薬物をリポソームに内包し漏出を抑制する方法として、バレンホルツらは、硫酸アンモニウムを用いたアンモニウムイオン勾配により得られるリポソーム内外のpH勾配の利用を考案した（特許第2659136号公報）。いずれの方法においても、用いるリポソームの粒子径に関する制約はなく、該リポソームは、小さなユニラメラ小胞（Small Unilamellar Vesicle, SUV）、大きなユニラメラ小胞（Large Unilamellar Vesicle, LUV）、多重ラメラ小胞（Multilamellar Vesicle, MLV）などから構成されている。一方、マウラーらは、シプロフロキサシンを硫酸アンモニウムを用いたpH勾配を利用した方法で平均粒子径が190nmのLUVに内包したとき、50%マウス血清中、37°Cの条件でシプロフロキサシンの漏出が速やかに起こることを報告している〔バイオキミカ・エト・バイオフィジカ・アクタ（Biochim. Biophys. Acta），1374，9（1998）〕。彼ら

は、シプロフロキサシンはドキソルビシンなどとは異なり、リポソーム内部で結晶化 (precipitation) していないため漏出が起きるとしている。このように、前述の二つの特許で示される方法は、リポソームに内包された薬物の漏出を考えた場合、必ずしも最良の方法とは言えず、さらなる改良が望まれている。

発明の開示

本発明の目的は、リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なリポソーム製剤を提供することにある。

本発明者らは、UCN-01などのインドロカルバゾール誘導体をリポソーム化することにより生体内における安定性の向上などが図られることを見い出している (WO 97/48398)。



UCN-01

その後、鋭意検討を重ねたところ、リポソームの平均粒子径を 120 nm 以上とする、あるいは脂質二重膜の層の枚数を複数枚以上にすることにより、薬物漏出を効率良く抑制できることを見い出した。また、脂質二重膜の構成成分に相転移温度の高い成分を併用することにより薬物の漏出を抑制できることを見い出した。

すなわち、本発明は、リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすることを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法、またはリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包さ

れた薬物の漏出抑制方法に関する。

また、本発明は、リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リポソームの平均粒子径を120nm以上にすること、およびリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの3つから選ばれる2つ以上を満たすことを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法に関する。

また、本発明は、リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とし、リポソームの平均粒子径を120nm以上にすることを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法に関する。

また、本発明により、リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリポソームの平均粒子径が120nm以上であるリポソーム製剤、リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリポソーム製剤、またはリポソームの平均粒子径が120nm以上であり、かつリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリポソーム製剤が提供される。

さらに、本発明により、リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であること、リポソームの平均粒子径が120nm以上であること、およびリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であることの3つから選ばれる2つ以上を満たすリポソーム製剤が提供される。

上記各リポソーム製剤により、生体成分存在下でリポソームに内包された薬物の漏出が抑制される。

リポソームを構成する脂質としては、例えばリン脂質、グリセロ糖脂質、スフィンゴ糖脂質、コレステロールなどが用いられ、特にリン脂質が好ましく用いられる。これらの中でも、相転移温度が生体内温度（35～37°C）より高いものが好ましい。これらの脂質は、ポリソルベート80、ブルロニックF68などの非イオン性界面活性剤、塩化ベンザルコニウムなどのカチオン性界面活性剤、ラウリル硫酸ナトリウムなどのアニオン性界面活性剤、デキストランなどの多糖類もしくはその誘導体、ポリオキシエチレンラウリルアルコール、ポリエチレングリコールなどのポリオキシエチレン誘導体などにより改質されていてもよい。

リン脂質としては、例えばホスファチジルコリン（大豆ホスファチジルコリン、卵黄ホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンなど）、ホスファチジルエタノールアミン（ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンなど）、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルコリン、スフィンゴミエリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質、卵黄レシチン、大豆レシチン、水素添加リン脂質などの天然または合成のリン脂質などがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37°C）より高いもの（例えばジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、N-ステアロイルスフィンゴミエリンなど）が好ましい。

グリセロ糖脂質としては、例えばスルホキシリボシルグリセリド、ジグリコシルジグリセリド、ジガラクトシルジグリセリド、ガラクトシルジグリセリド、グリコシルジグリセリドなどがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37°C）より高いもの（例えば1,2-0-ジパルミトイール-3-0-β-D-グルクロノシル-*s n*-グリセロール、1,2-0-ジステアロイル-3-0-β-D-グルクロノシル-*s n*-グリセロールなど）が好ましい。

また、スフィンゴ糖脂質としては、例えばガラクトシルセレブロシド、ラクトシルセレブロシド、ガングリオシドなどがあげられ、これらのうち相転移温度が生体内温度（35～37°C）より高いもの（例えばN-ステアロイルジヒドロガラクトシルスフィンゴシン、N-ステアロイルジヒドロラクトシルスフィンゴシンなど）が好ましい。

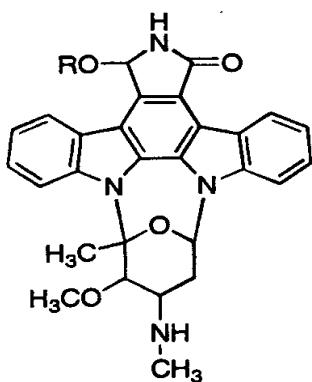
これらは、単独あるいは組み合わせて用いられる。組み合わせて用いる場合、例えば、水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも二成分以上からなる脂質、ジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも二成分以上からなる脂質などが、脂質として用いられる。ここで、ポリエチレングリコール修飾リン脂質

におけるリン脂質としては、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミンなどのホスファチジルエタノールアミンが好ましく用いられる。

また必要に応じて、脂質成分と共に、膜安定化剤としてコレステロールなどのステロール類など、抗酸化剤としてトコフェロールなど、荷電物質としてステアリルアミン、ジセチルホスフェート、ガンリオシドなどを用いてもよい。

リポソームに内包される薬物としては、例えばインドロカルバゾール誘導体、制癌剤、抗生物質、抗真菌剤、薬理学的活性を有する物質などがあげられる。

インドロカルバゾール誘導体としては、例えばUCN-01およびその誘導体など（例えば下記化合物）があげられる。



（式中、Rは水素または低級アルキルを表す）

Rの定義における低級アルキルは、直鎖もしくは分枝状の炭素数1～6のアルキル、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、sec-ブチル、tert-ブチル、ベンチル、ヘキシルなどを意味する。

制癌剤としては、例えばアクチノマイシンD、マイトイマイシンC、クロモマイシン、ドキソルビシン、エビルビシン、ビノレルビン、ダウノルビシン、アクラルビシン、ブレオマイシン、ペプロマイシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、エトポサイド、メソトレキセート、5-Fu、テガフル、シタラビン、エノシタビン、アンシタビン、タキソール、タキソテーレ、シスプラチニン、シトシンアラビノシド、イリノテカン、およびこれらの誘導体などがあげられる。

抗生物質としては、例えばミノサイクリン、テトラサイクリン、ビペラシリンナトリウム、トシリ酸スルタミシリン、アモキシシリン、アンピシリン、バカンビシリン、アスボシシリン、セフジニル、フロモキセフナトリウム、セフオチアム、セフカベンビボキシル、セファクロル、セフトレンビボシル、セファゾリンナトリウム、セフォゾラン、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、エリスロマイシン、レボフロキサシン、トシリ酸トスフロキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、アルベカシン、イセバマイシン、ジベカシン、アミカシン、ゲンタミシン、バンコマイシン、ホスホマイシン、およびこれらの誘導体などがあげられる。

抗真菌剤としては、例えばフルコナゾール、イトラコナゾール、テルビナフィン、アムホテリシンB、ミコナゾール、およびこれらの誘導体などがあげられる。

薬理学的活性を有する物質としては、例えばホルモン、酵素、蛋白、ペプチド、アミノ酸、核酸、遺伝子、ビタミン類、糖類、脂質、合成医薬品などがあげられる。

生体成分としては、例えば血液成分などがあげられる。

次に、本発明のリポソーム製剤の製造方法について説明する。

本発明のリポソーム製剤の製造には、公知のリポソーム製剤の調製方法が適用できる。公知のリポソーム製剤の調製方法としては、例えばバンハム (B a n g h a m) らのリポソーム調製法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. M o l. B i o l.) , 13, 238 (1965)]、エタノール注入法 [ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー (J. C e l l. B i o l.) , 66, 621 (1975)]、フレンチプレス法 [フェブス・レター (F E B S L e t t.) 99, 210 (1979)]、凍結融解法 [アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス (A r c h . B i o c h e m. B i o p h y s.) , 212, 186 (1981)]、逆相蒸発法 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・ユー・エス・エー (P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A) , 75, 4194 (1978)]、pH勾配法 (特許第2572554号公報、特許第2659136号公報など) などがあげられる。

pH勾配法は、リポソームへの薬物の内包率が高いこと、リポソーム懸濁液中の残留有機溶媒が少ないとことなどの利点が多い。例えば、脂質をエタノールなどの溶媒に溶解後、なす型フラスコに入れ、減圧下溶媒留去し、脂質薄膜を形成する。次いで、酸性緩衝液（例えばクエン酸緩衝液）を加えて振とうし、大きなMLVを形成する。さらに、エクストルージョン法などにより、リポソームの平均粒子径を調製する（例えば130nm）。このリポソーム懸濁液にUCN-01などの薬物の弱酸性液を添加後、適当なpH調整剤（例えば水酸化ナトリウム水溶液）を加え、リポソーム懸濁液のpHを中性付近まで上昇（リポソーム懸濁液のpH上昇前とpH上昇後のpHの差は3以上が望ましい）させる。以上の操作により、リポソーム内部に薬物を定量的に包含させることができる。

また、非イオン性界面活性剤、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、多糖類およびその誘導体、ポリオキシエチレン誘導体などによるリポソーム表面改質も任意に行うことができる〔*Stealth Liposomes*, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, pp. 93-102, 1995年〕。さらに、ターゲッティングに応用するため、抗体、蛋白、ペプチド、脂肪酸類などによるリポソーム表面修飾を行うこともできる〔*Stealth Liposomes*, ed. by D. D. Lasic and F. Martin, CRC Press Inc., Florida, pp. 93-102, 1995年〕。

リポソームを懸濁させる溶液としては、水以外に酸、アルカリ、種々の緩衝液、生理的食塩液、アミノ酸輸液などを用いてもよい。また、クエン酸、アスコルビン酸、システイン、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などの抗酸化剤をリポソーム懸濁液に添加してもよい。また、等張化剤として、例えば、グリセリン、ブドウ糖、塩化ナトリウムなどの添加も可能である。

また、薬物と脂質とをエタノールなどの有機溶媒に溶解し、溶媒留去した後、生理食塩水などを添加、振とう攪拌し、リポソームを形成させることもできる。

リポソームの平均粒子径は、120nm以上であることが好ましく、120

～500 nmであることがさらに好ましい。平均粒子径を調節する方法としては、上述のエクストルージョン法などがあげられる。

脂質二重膜の枚数を複数枚以上とする方法としては、0.2 μm、0.4 μmあるいはそれ以上の大きめの孔を有するメンブランフィルターを用いたエクストルージョン法、大きなMLVを機械的に粉碎（マントンゴウウリン、マイクロフルイダイザーなどを使用）する方法〔R. H. Muller, S. Benita, B. Bohm編著, “Emulsion and Nanosuspensions for the Formulation of Poorly Soluble Drugs”, High-Pressure Homogenization Techniques for the Production of Liposome Dispersions: Potential and Limitations, M. Brandl, pp. 267-294, 1998 (Scientific Publishers Stuttgart, Germany)〕などがあげられる。

上記の方法などにより得られるリポソーム製剤は、そのままでも使用できるが、使用目的、保存条件などにより、マンニトール、ラクトース、グリシンなどの賦形剤を加えて凍結乾燥することもできる。また、グリセリンなどの凍結保存剤を加えて凍結保存してもよい。

本発明で得られるリポソーム製剤は、注射剤として用いるのが一般的であるが、経口剤、点鼻剤、点眼剤、経皮剤、坐剤、吸入剤などとして加工して使用することもできる。

本発明で得られるリポソーム製剤は、生体成分中、例えば血液成分中の薬物の安定化、副作用の低減および腫瘍への集積性の増大を目的としている。

次に、試験例により、本発明の効果について説明する。

試験例 1

ヒトAGP添加ラットプラズマ中（ヒトAGP 0.5 mg/mL）におけるリポソーム内に包含したUCN-01の経時的な漏出を調べるため、実施例1～4および比較例1～3で調製したUCN-01包含リポソーム懸濁液0.1 mLに蒸留水0.9 mLを加えて混合した。この液0.05 mLにヒトAG

Pを0.5mg/mL添加したラットプラズマ4.95mLを加えて混合し、試料液とした。混合直後、および37°Cで3時間保存した後、試料液2mLをゲルfiltration (Sephadex CL-6B、Φ20mm×20cm、移動相：PBS (リン酸緩衝食塩水)、試料添加量：2mL、フラクション採取量：約4mL) した。リポソーム画分と蛋白画分を分離し、溶出液0.4mL当たり2-プロパノールを0.8mL加えて振とうした。その後、4°C下、12,000g×10分の遠心分離を行い、上清20μLを下記の条件で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析した。

HPLC分析条件

カラム：YMC-Pack ODS-AM AM-312 150mm×6mm (YMC)

移動相：0.1%トリエチルアミン添加0.05mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.3)：アセトニトリル=1容量部：1容量部

流速：1.0mL/分

カラム保持温度：25°C

検出：励起波長310nm、蛍光波長410nm

リポソーム中のUCN-01残存率は、まず、リポソーム画分中のUCN-01含有率を求め、ゲルfiltrationの回収 (リポソーム画分中と蛋白画分中のUCN-01の合計) 率 [(A+B)/C] で補正することにより、下記の式により算出した。

$$\text{リポソーム画分中のUCN-01含有率 (\%)} = (A/C) \times 100$$

$$\text{蛋白画分中のUCN-01含有率 (\%)} = (B/C) \times 100$$

A：リポソーム画分中のUCN-01量

B：蛋白画分中のUCN-01量

C：ゲルfiltrationに供したリポソーム懸濁液中のUCN-01量

リポソーム中のUCN-01残存率(%)

= [リポソーム画分中のUCN-01含有率(%) / ゲル濾過の回収率(%)] × 100

結果を表1に示す。

表1 リポソーム中のUCN-01残存率

UCN-01 残存率(%)		
実施例1	混合直後	95
	3時間後	80
実施例2	混合直後	91
	3時間後	57
実施例3	混合直後	94
	3時間後	63
実施例4	混合直後	99
	3時間後	81
比較例1	混合直後	90
	3時間後	37
比較例2	混合直後	23
	3時間後	0
比較例3	混合直後	93
	3時間後	5

以下に、本発明の実施例および比較例を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例1

5 gの水素添加大豆ホスファチジルコリン{相転移温度: 58°C [F E B S Lett., 386, 247-251 (1996)]}に、25 mLの100 mmol/Lクエン酸緩衝液(pH 4.0)を加え、ボルテックスミキサーで

振とう攪拌した。この懸濁液を、70°Cで0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、10mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液8mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を10mLとした。70°Cで5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包含した。

動的光散乱(DLS) [A model DLS-700, Otsuka Electronics Ltd. (DLS-700、大塚電子)、以下同様]でリポソームの平均粒子径を測定したところ、186nmであった。

実施例2

5gの水素添加大豆ホスファチジルコリン {相転移温度: 58°C [FEBS Lett., 386, 247-251 (1996)]} に、25mLの100mmol/Lのクエン酸緩衝液(pH 4.0)を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70°Cで0.4μmのポリカーボネートメンブランフィルターを2回通過させた。さらに70°Cで0.2μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液を調製した。一方、10mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液8mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を10mLとした。70°Cで5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包含した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、130nmであった。

実施例3

実施例2で調製したUCN-01を含むリポソーム懸濁液5mLに、1.25g/mLの濃度のPEG-DSPE [1, 2-ジステアロイル-sn-グリ

セロー-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-（ポリエチレングリコール2000）；Avanti製]のエタノール溶液を0.05mL添加した後、70°Cで2分間加熱し、リポソーム表面をポリエチレングリコール（PEG）で被覆した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、136nmであった。

実施例4

0.7gのジステアロイルホスファチジルコリン〔DSPC、相転移温度：58°Cおよび56°C（野島庄七他編、リポソーム、p. 77、1988年、南江堂）〕に、約5mLの100mmol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.0）を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70°Cで0.4μmのポリカーボネートメンプランフィルターを10回通過させた。さらに、70°Cで0.2μmのポリカーボネートメンプランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、DSPCの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液4mLを添加した。さらに、1mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を5mLとした。70°Cで5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包含した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、180nmであった。

比較例1

20gの水素添加大豆ホスファチジルコリン〔相転移温度：58°C〔FEB Lett. , 386, 247-251 (1996)〕〕に、70mLの100mmol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.0）を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、70°Cで0.4μmのポリカーボネートメンプランフィルターを4回通過させた。さらに70°Cで0.1μmのポリカーボネートメンプランフィルターを10回通過させた。これに100mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、水素添加大豆ホスファチジルコリンの濃度が62.5mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、20mgのUCN-01

を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液 1.6 mLを添加した。さらに、1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を2.0 mLとした。70°Cで5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包含した。これを氷で冷却した後、UCN-01を含むリポソーム懸濁液 1.6 mLを取り、これに蒸留水 6.4 mLを加えた。超遠心分離操作（25°C、110,000 g × 1時間）を行い、上清 6.7 mLを除去した後、蒸留水を加えてUCN-01の濃度が1 mg/mLとなるよう再懸濁した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、109 nmであった。

比較例 2

1.5 gの卵黄ホスファチジルコリン〔Egg PC、相転移温度：-15~-7°C（野島庄七他編、リポソーム、p. 77、1988年、南江堂）〕に、7.5 mLの100 mmol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.0）を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、室温で0.4 μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100 mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、Egg PCの濃度が62.5 mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5 mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液4 mLを添加した。さらに、1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を5 mLとした。室温で、UCN-01をリポソーム内に包含した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、274 nmであった。

比較例 3

1. 1 gのジバルミトイルホスファチジルコリン〔DPPC、相転移温度：41°Cおよび35°C（野島庄七他編、リポソーム、p. 77、1988年、南江堂）〕に、約7 mLの100 mmol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.0）を加え、ボルテックスミキサーで振とう攪拌した。この懸濁液を、55°Cで0.4 μmのポリカーボネートメンブランフィルターを15回通過させた。さらに、55°Cで0.2 μmのポリカーボネートメンブランフィルターを10回通過させた。これに100 mmol/Lのクエン酸緩衝液を加え、DPPCの濃度が6

2. 5 mg/mLのリポソーム懸濁液となるよう調製した。一方、5 mgのUCN-01を量り取り、先に調製したリポソーム懸濁液4 mLを添加した。さらに、1 mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液を適量添加してpHを8にした後、蒸留水を加えて全量を5 mLとした。55°Cで5分間加熱し、UCN-01をリポソーム内に包含した。

DLSでリポソームの平均粒子径を測定したところ、179 nmであった。

産業上の利用可能性

本発明により、リポソームに内包された薬物の漏出抑制方法および生体内で安定なりポソーム製剤が提供される。

請求の範囲

1. リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすることを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法。
2. リポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法。
3. リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とすること、リポソームの平均粒子径を 120 nm 以上にすること、およびリポソームを構成する脂質として相転移温度が生体内温度より高い脂質を使用することの 3 つから選ばれる 2 つ以上を満たすことを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法。
4. 脂質が水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求の範囲 2 または 3 に記載の漏出抑制方法。
5. 脂質がジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求の範囲 2 または 3 に記載の漏出抑制方法。
6. リポソームの脂質二重膜の枚数を複数枚以上とし、リポソームの平均粒子径を 120 nm 以上にすることを特徴とする、生体成分存在下でのリポソームに内包された薬物の漏出抑制方法。
7. リポソームの平均粒子径が 120 ~ 500 nm である請求の範囲 3 または 6 に記載の漏出抑制方法。
8. 生体成分が血液成分である請求の範囲 1 ~ 7 のいずれかに記載の漏出抑制方法。
9. 内包される薬物がインドロカルバゾール誘導体である請求の範囲 1 ~ 8 のいずれかに記載の漏出抑制方法。
10. 内包される薬物が制癌剤である請求の範囲 1 ~ 8 のいずれかに記載の漏出抑制方法。
11. 内包される薬物が抗生物質である請求の範囲 1 ~ 8 のいずれかに

記載の漏出抑制方法。

12. 内包される薬物が薬理学的活性を有する物質である請求の範囲1～8のいずれかに記載の漏出抑制方法。

13. リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリポソームの平均粒子径が120nm以上であるリポソーム製剤。

14. リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であり、かつリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリポソーム製剤。

15. リポソームの平均粒子径が120nm以上であり、かつリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であるリポソーム製剤。

16. リポソームの脂質二重膜の枚数が複数枚以上であること、リポソームの平均粒子径が120nm以上であること、およびリポソームを構成する脂質が相転移温度が生体内温度より高い脂質であることの3つから選ばれる2つ以上を満たすリポソーム製剤。

17. 生体成分存在下でリポソームに内包された薬物の漏出を抑制する請求の範囲13～16のいずれかに記載のリポソーム製剤。

18. 生体成分が血液成分である請求の範囲17に記載のリポソーム製剤。

19. 脂質が水素添加大豆ホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求の範囲14～18のいずれかに記載のリポソーム製剤。

20. 脂質がジステアロイルホスファチジルコリン、ポリエチレングリコール修飾リン脂質およびコレステロールから選ばれる少なくとも一成分以上からなる請求の範囲14～18のいずれかに記載のリポソーム製剤。

21. リポソームの平均粒子径が120～500nmである請求の範囲13、15～18のいずれかに記載のリポソーム製剤。

22. 内包される薬物がインドロカルバゾール誘導体である請求の範囲13～21のいずれかに記載のリポソーム製剤。

23. 内包される薬物が制癌剤である請求の範囲13～21のいずれか

に記載のリポソーム製剤。

24. 内包される薬物が抗生物質である請求の範囲13～21のいずれかに記載のリポソーム製剤。

25. 内包される薬物が薬理学的活性を有する物質である請求の範囲13～21のいずれかに記載のリポソーム製剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K9/127

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/03652, A1 (DEPOTECH CORPORATION), 06 February, 1997 (06.02.97),	1
Y	Full text & JP, 11-508900, A & US, 5931809, A	3-14, 16-25
X	JP, 8-59503, A (Teijin Limited), 05 March, 1996 (05.03.96),	1
Y	Full text (Family: none)	3-14, 16-25
X	EP, 451791, A2 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT), 16 October, 1991 (16.10.91),	2
Y	Full text & JP, 4-234820, A	3-12, 14-25
Y	JP, 2-86841, A (TERUMO CORORATION), 27 March, 1990 (27.03.90), page 2, lower right column (Family: none)	3-13, 15-25
Y	JP, 7-41432, A (Teijin Limited), 10 February, 1995 (10.02.95), Par. No. [0020] (Family: none)	3-13, 15-25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

“A”	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T”	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“E”	earlier document but published on or after the international filing date	“X”	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L”	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y”	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O”	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&”	document member of the same patent family
“P”	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 08 September, 2000 (08.09.00)	Date of mailing of the international search report 19 September, 2000 (19.09.00)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP00/04140

C. (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 850646, A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 01 July, 1998 (01.07.98), Full text & WO, 97/48398, A1	9,22

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/04140

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C17 A61K9/127

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C17 A61K9/127

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X /	WO, 97/03652, A1 (DEPOTECH CORPORATION) 6. 2月. 1997 (06. 02. 97)	1 /
Y	全文 & JP, 11-508900, A & US, 5931809, A	3-14, 16-25
X /	JP, 8-59503, A (帝人株式会社) 5. 3月. 1996 (05. 03. 96)	1 /
Y	全文 (ファミリーなし)	3-14, 16-25

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上
の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 09. 00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4 C 9841



電話番号 03-3581-1101 内線 6460

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	EP, 451791, A2 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 16. 10月. 1991 (16. 10. 91)	2
/		/
Y	全文 & JP, 4-234820, A	3-12, 14-25
Y	JP, 2-86841, A (テルモ株式会社) 27. 3月. 1990 (27. 03. 90) 第2頁右下欄 (ファミリーなし)	3-13, 15-25
Y	JP, 7-41432, A (帝人株式会社) 10. 2月. 1995 (10. 02. 95) 第【0020】段落 (ファミリーなし)	3-13, 15-25
Y	EP, 850646, A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 1. 7月. 1998 (01. 07. 98) 全文 & WO, 97/48398, A1	9, 22

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 27 JUL 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 1215	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/04140	国際出願日 (日、月、年) 23.06.00	優先日 (日、月、年) 24.06.99
国際特許分類 (IPC) Int. C17 A61K9/127		
出願人（氏名又は名称） 協和醸酵工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I 国際予備審査報告の基礎

II 優先権

III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV 発明の單一性の欠如

V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ある種の引用文献

VII 国際出願の不備

VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 19.01.01	国際予備審査報告を作成した日 16.07.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 (印) 電話番号 03-3581-1101 内線 6247

THIS PAGE BLANK (verso)

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (18pt)
18pt

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 3-25 請求の範囲 1, 2	有 無
進歩性 (IS)	請求の範囲 1-25 請求の範囲	有 無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲 1-25 請求の範囲	有 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

国際調査報告において以下の文献が示された。

文献1: WO, 97/03652, A1
 文献2: JP, 8-59503, A
 文献3: EP, 451791, A2
 文献4: JP, 2-86841, A
 文献5: JP, 7-41432, A
 文献6: EP, 850646, A1

文献1には多層リポソームを持続性放出性剤に用いる旨記載されている。

文献2にはリポソーム製剤を外皮リポソームと内封リポソームで構成することにより活性成分の血中濃度の持続性が得られる旨記載されている。

文献3には少なくとも37°Cの層転移温度を有する脂質を長期作用持続性リポソーム製剤に用いる旨記載されている。

文献4にはリポソームの粒子径について、180nmより小さいと、エネルギー的に不安定な微粒子が融合を起こして大きな粒子を形成してしまい、毛細血管をつまらせる原因となることがある旨記載されている。

文献5には多重層リポソームの粒子径が400~3500nmである旨記載されている。

文献6にはインドロカルバゾール誘導体のリポソーム製剤が記載されている。

してみれば、文献1~4の記載から、リポソーム製剤からの薬物の漏出を抑制する目的でリポソームを多層構造とすること、および、構成脂質の層転移温度を生体内温度よりも高くすることは本国際出願の出願前に公知であり、また、リポソームの粒子径が180nmより小さいと融合を起こして大きな粒子を形成してしまい、毛細血管につまる等の不都合を生じてしまうことから粒子径を適度なものとする必要があることも知られていたものと認められる。

また、文献5の記載から、リポソームを多重層とした場合には、請求の範囲に記載された「120nm以上」なる構成を必然的に有するものになると認められる。

また、文献6からインドロカルバゾール誘導体をリポソーム製剤とすることは知られている。

以上より、請求の範囲1, 2に記載の発明は新規性及び進歩性を有しない。

請求の範囲3-25に記載の発明は進歩性を有しない。

請求の範囲1-25に記載の発明は産業上の利用可能性を有する。

THIS PAGE BLANK (uspto)

VIII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 1 について、明細書において示されている実施例はいずれも層転移温度が生体内より高い脂質を使用しており、かつ、リポソームの平均粒子径が 120 nm 以上であるので、リポソームの脂質二重膜を複数枚としたことにより生じる効果が把握できない。

請求の範囲 2 について、比較例 1 は請求項 2 の発明の概念に包含されるものであるが所望の効果が得られていない。

THIS PAGE BLANK (reverse)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 1215	FOR FURTHER ACTION	SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/04140	International filing date (day/month/year) 23 June 2000 (23.06.00)	Priority date (day/month/year) 24 June 1999 (24.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 9/127		
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 January 2001 (19.01.01)	Date of completion of this report 16 July 2001 (16.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (use reverse)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04140

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS IS THE
BLANK (up to)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/04140

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-25	YES
	Claims	1, 2	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-25	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are cited in the international search report.

Document 1: WO, 97/03652, A1

Document 2: JP, 8-59503, A

Document 3: EP, 451791, A2

Document 4: JP, 2-86841, A

Document 5: JP, 7-41432, A

Document 6: EP, 850646, A

Document 1 discloses the use of multilayered liposomes in a sustained release preparation.

Document 2 discloses a liposome preparation with an outer liposome skin encapsulating an inner liposome, giving a sustained concentration of an active ingredient in blood.

Document 3 discloses the use of a lipid with a layer transition temperature of at least 37°C in a liposome preparation giving a long-term sustained action.

Document 4 indicates that when the size of liposome particles is less than 180 nm, the energetically unstable fine particles fuse to form larger particles and this can cause blockage of capillary blood vessels.

In Document 5 the size of multilayer liposomes is given as 400-3500 nm.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/JP 00/04140

Document 6 discloses liposome preparations of an indrocarbazole derivative.

Therefore, production of liposomes with a multilayer structure in order to suppress leakage of a drug from the liposomes, and using a structural lipid with a layer transition temperature higher than body temperature, were known from Documents 1-4 before the filing date of the present international application, and it was also known to be necessary to select an appropriate particle size because when the size of liposome particles is less than 180 nm they fuse to form larger particles, causing problems such as blockage of capillary blood vessels.

Moreover, the disclosure in Document 5 indicates that multilayer liposomes inevitably have a structure "of 120 nm or greater" as described in the present claims.

Furthermore, liposome preparations of indrocarbazole derivatives are known from Document 6.

Therefore, the inventions described in Claims 1 and 2 are not novel and do not involve an inventive step.

The inventions described in Claims 3-25 do not involve an inventive step.

The inventions described in Claims 1-25 are industrially applicable.

THIS PAGE BLANK (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/JP 00/04140**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

In connection with Claim 1, in all of the examples in the description a lipid is used which has a layer transition temperature higher than body temperature, and the mean particle diameter of the liposomes is 120 nm or greater; it is thus impossible to assess the effects of a plurality of double lipid films in the liposomes.

In connection with Claim 2, Comparison Example 1 incorporates the concept of the invention in Claim 2, but the desired effect is not achieved.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 1215

Box No. I TITLE OF INVENTION

METHOD OF INHIBITING LEAKAGE OF DRUG ENCAPSULATED IN LIPOSOMES

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

6-1, Otemachi 1-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185 Japan

This person is also inventor.

Telephone No.
03-3282-0036

Facsimile No.
03-3282-1527

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

JP

State (that is, country) of residence:

JP

This person is applicant for the purposes of: all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KATO Yasuki

c/o Pharmaceutical Research Institute

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

1188, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-8731 Japan

This person is:

applicant only

applicant and inventor

inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JP

State (that is, country) of residence:

JP

This person is applicant for the purposes of: all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: agent common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

YAMAUCHI Masahiro

c/o Pharmaceutical Research Institute
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
1188, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-8731 Japan

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JP

State (that is, country) of residence:

JP

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

KUSANO Hiroko

c/o Pharmaceutical Research Institute
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
1188, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-8731 Japan

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JP

State (that is, country) of residence:

JP

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

ISHIHARA Atsushi

c/o Pharmaceutical Research Institute
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
1188, Shimotogari, Nagaizumi-cho, Sunto-gun, Shizuoka
411-8731 Japan

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

JP

State (that is, country) of residence:

JP

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

 applicant only applicant and inventor inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

 all designated States all designated States except the United States of America the United States of America only the States indicated in the Supplemental Box Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

THIS PAGE BLANK (USP TO)

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

AP ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT

EA Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT

EP European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT

OA OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

<input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates	<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia	
<input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua and Barbuda	<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka	
<input checked="" type="checkbox"/> AL Albania	<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia	
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia	<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho	
<input checked="" type="checkbox"/> AT Austria	<input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania	
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australia	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg	
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan	<input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia	
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina	<input checked="" type="checkbox"/> MA Morocco	
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova	
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar	
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil	<input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia	
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia	
<input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi	
<input checked="" type="checkbox"/> CA Canada	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico	
<input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein	<input checked="" type="checkbox"/> MZ Mozambique	
<input checked="" type="checkbox"/> CN China	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norway	
<input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica	<input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand	
<input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba	<input checked="" type="checkbox"/> PL Poland	
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal	
<input checked="" type="checkbox"/> DE Germany	<input checked="" type="checkbox"/> RO Romania	
<input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation	
<input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan	
<input checked="" type="checkbox"/> DZ Algeria	<input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden	
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore	
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spain	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia	
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finland	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia	
<input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone	
<input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan	
<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan	
<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana	<input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey	
<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago	
<input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia	<input checked="" type="checkbox"/> TZ United Republic of Tanzania	
<input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine	
<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda	
<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel	<input checked="" type="checkbox"/> US United States of America	
<input checked="" type="checkbox"/> IN India	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan	
<input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland	<input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam	
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan	<input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia	
<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya	<input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa	
<input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe	
<input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea	Check-box reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:	
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea	<input type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan		

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office with in the 15-month time limit.)

THIS PAGE BLANK (USRT0)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

 Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 24.06.99	Patent Application 11-178142	JP		
item (2)				
item (3)				

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s): (1)

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / JP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)

Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : 4
description (excluding sequence listing part) : 14
claims : 3
abstract : 1
drawings : 0
sequence listing part of description : 0

Total number of sheets : 22

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

- fee calculation sheet
- separate signed power of attorney
- copy of general power of attorney; reference number, if any:
- statement explaining lack of signature
- priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
- translation of international application into (language):
- separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
- nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
- other (specify):

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: Japanese

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

YAMAUCHI Masahiro

ISHIHARA Atsushi

KATO Yasuki

KUSANO Hiroko

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	<input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / JP	6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

THIS PAGE BLANK (use reverse)

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED

NOV - 6, 2000

PCT

WP PJP.

P. DEPT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 23 October 2000 (23.10.00)		From the INTERNATIONAL BUREAU To: KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. 6-1, Otemachi 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-8185 JAPON	
Applicant's or agent's file reference 1215		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/JP00/04140		International filing date (day/month/year) 23 June 2000 (23.06.00)	
International publication date (day/month/year) Not yet published		Priority date (day/month/year) 24 June 1999 (24.06.99)	
Applicant KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al			
<p>1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).</p> <p>2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.</p> <p>3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.</p> <p>4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.</p>			
<u>Priority date</u> 24 June 1999 (24.06.99)	<u>Priority application No.</u> 11/178142	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> JP	<u>Date of receipt of priority document</u> 11 Augu 2000 (11.08.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

C. Villet



Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (use to)

RECEIVED

JAN 15, 2001

I.P. DEPT

WPCJD

PCT

PLPJD

PCLD

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Ohtemachi 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185
JAPONDate of mailing (day/month/year)
04 January 2001 (04.01.01)Applicant's or agent's file reference
1215

IMPORTANT NOTICE

International application No. PCT/JP00/04140 International filing date (day/month/year) 23 June 2000 (23.06.00) Priority date (day/month/year) 24 June 1999 (24.06.99)

Applicant
KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AG,AU,BZ,DZ,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,
GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,
NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 04 January 2001 (04.01.01) under No. WO 01/00173

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (12/16/13)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

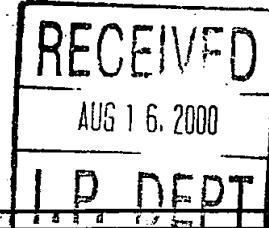
PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
6-1, Otemachi 1-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 25 July 2000 (25.07.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 1215	International application No. PCT/JP00/04140

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. (for all designated States except US)
KATO, Yasuki et al (for US)

International filing date : 23 June 2000 (23.06.00)

Priority date(s) claimed : 24 June 1999 (24.06.99)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau : 07 July 2000 (07.07.00)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- time limits for entry into the national phase
- confirmation of precautionary designations
- requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Masashi HONDA
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPS)

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
 [P C T 18条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 1215	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 4 1 4 0	国際出願日 (日、月、年) 23. 06. 00	優先日 (日、月、年) 24. 06. 99
出願人(氏名又は名称) 協和醸酵工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 18条)の規定に従い出願人に送付する。
 この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第_____図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (reverse)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' A61K9/127

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' A61K9/127

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X /	WO, 97/03652, A1 (DEPOTECH CORPORATION) 6. 2月. 1997 (06. 02. 97)	1 /
Y	全文 & JP, 11-508900, A & US, 5931809, A	3-14, 16-25
X /	JP, 8-59503, A (帝人株式会社) 5. 3月. 1996 (05. 03. 96)	1 /
Y	全文 (ファミリーなし)	3-14, 16-25

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4C 9841



電話番号 03-3581-1101 内線 6460

THIS PAGE BLANK (use P70)

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X /	E P, 4 5 1 7 9 1, A 2 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) 1 6. 1 0 月. 1 9 9 1 (1 6. 1 0. 9 1)	2 /
Y	全文 & J P, 4-2 3 4 8 2 0, A	3-12, 14-25
Y	J P, 2-8 6 8 4 1, A (テルモ株式会社) 2 7. 3 月. 1 9 9 0 (2 7. 0 3. 9 0) 第2頁右下欄 (ファミリーなし)	3-13, 15-25
Y	J P, 7-4 1 4 3 2, A (帝人株式会社) 1 0. 2 月. 1 9 9 5 (1 0. 0 2. 9 5) 第【0 0 2 0】段落 (ファミリーなし)	3-13, 15-25
Y	E P, 8 5 0 6 4 6, A 1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) 1. 7 月. 1 9 9 8 (0 1. 0 7. 9 8) 全文 & WO, 9 7 / 4 8 3 9 8, A 1	9, 22

THIS PAGE BLANK (use reverse)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04140

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K9/127

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 97/03652, A1 (DEPOTECH CORPORATION), 06 February, 1997 (06.02.97), Full text	1
Y	& JP, 11-508900, A & US, 5931809, A	3-14, 16-25
X	JP, 8-59503, A (Teijin Limited), 05 March, 1996 (05.03.96), Full text (Family: none)	1
Y	JP, 4-234820, A	3-14, 16-25
X	EP, 451791, A2 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT), 16 October, 1991 (16.10.91), Full text	2
Y	& JP, 4-234820, A	3-12, 14-25
Y	JP, 2-86841, A (TERUMO CORORATION), 27 March, 1990 (27.03.90), page 2, lower right column (Family: none)	3-13, 15-25
Y	JP, 7-41432, A (Teijin Limited), 10 February, 1995 (10.02.95), Par. No. [0020] (Family: none)	3-13, 15-25

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 September, 2000 (08.09.00)

Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04140

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 850646, A1 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.), 01 July, 1998 (01.07.98), Full text & WO, 97/48398, A1	9,22

THIS PAGE BLANK (USPTO)